

平成 24 年度 外部精度管理調査結果

平成 24 年度の細菌試験、水質試験に関する試験検査精度管理調査を実施し、その結果を平成 24 年 12 月 19 日に開催した試験検査精度管理委員会において協議した。(平成 24 年度の委員名簿は表 1 のとおり)
調査の結果を報告する。

表 1 平成24年度試験検査精度管理委員会委員

氏 名	所 属・職 名	氏 名	所 属・職 名
平井 義一	自治医科大学医学部 教授	小林 延年	保健福祉部健康増進課長
柳原 尚久	帝京大学理工学部 教授	田辺 悦夫	保健福祉部生活衛生課長
前田 勇	宇都宮大学農学部 准教授	八島 利光	保健福祉部業務課長
小林 雅興	県南健康福祉センター所長 (県南保健所長)	菊池 文雄	宇都宮市保健福祉部保健福祉総務課長
塚田 三夫	県北健康福祉センター地域保健部長 (県北保健所長)	吉成 享	栃木県計量検定所長
今井 清人	環境森林部環境保全課長	宇賀神 貞夫	栃木県計量協会環境計量証明部会長
湯澤 元浩	環境森林部廃棄物対策課長	野澤 勝徳	保健環境センター所長
北村 直也	環境森林部馬頭処分場整備室長		

細菌試験（担当：微生物部）

1 実施機関

試料の調製・配布及び結果の取りまとめは、栃木県保健環境センターが行った。

2 参加機関

県西健康福祉センター、県東健康福祉センター、県南健康福祉センター、県北健康福祉センター、安足健康福祉センター、県南食肉衛生検査所、県北食肉衛生検査所、宇都宮市食肉衛生検査所、宇都宮市衛生環境試験所の 9 機関が参加し、結果の記載に当っては 1 から 9 の番号を付けて評価を行うこととした。

3 実施項目及び配布機関

配布菌No.	実施項目	配布機関No.
A-1	Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> (EHEC) 0157 : H7 VT1(+) VT2(+)	2, 5, 6, 8
B-1	Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> (EHEC) 026 : H11 VT1(+) VT2(-)	1, 3, 4, 7, 9
C-1	<i>Salmonella</i> Thyphimurium 04:i:1,2	4, 7
D-1	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> 03:K6	1, 5, 9
E-1	<i>Aeromonas hydrophila</i>	3, 6, 8
F-1	<i>Staphylococcus aureus</i> Enterotoxin-A、コアグラゼⅢ型	2

4 実施期間

平成 24 年 9 月 4 日に検査試料を配布し、9 月 28 日までに事務局あて報告することとした。

5 試料の調製及び配布

5.1 試料の調製

試料の調製は保健環境センターにおいて行った。供試菌株は、配布前日にトリプティケイブソイブロス (TSB) に接種し 37℃ 5 時間振とう培養を行った。但し、*Vibrio parahaemolyticus* 03:K6 の培養液は 3%NaCl 加 TSB を用いた。各供試菌株培養液・懸濁液は遠心による菌体洗浄後、滅菌リン酸緩衝食塩水 (PBS) に懸濁した。この懸濁液の吸光度と予め作成しておいた菌量の検量線から菌数を求め、各供試菌液は供試菌数 ($\geq 1.0 \times 10^5$ CFU/ml) になるように、PBS に再懸濁した。検査試料には糞便由来株として 1 菌株を添加した 6 種類の試料母液を用意した。検査試料は全てこの 6 種類の試料母液から分注し、配布まで 4℃で保管した。

5.2 試料の配布

対象機関には、試料母液から分注した検査試料を配布した。各機関は保冷剤により検査試料を冷蔵状態で国際規格容器(国連番号：UN2814)にて搬送し、受領後速やかに検査に入るよう指示した。検査試料に含まれる菌がヒトに引き起こす主な臨床症状をコメントとして添付した。

6 調査結果および考察

6.1 結果の概要

表2の同定結果に示すようにほとんどの検査機関において良好な結果が得られた。但し、1機関でA-1を同定出来なかったが、再検査を実施したところ同定できた。

6.2 EHEC 0157:H7 VT1(+) VT2(+)の結果について (表3,4)

配布したのは4機関で、2機関でEHEC 0157 VT1(+) VT2(+), 1機関でEHEC 0157 : H7 VT1(+)VT2(+)と同定され、良好な結果が得られた。1機関でEHEC 0157 VT1(+) VT2(-)という誤同定が為されたが、再検査ではEHEC 0157 VT1(+) VT2(+)と同定された。

分離培地は、DHL、クロモアガー0157、血液寒天培地の併用機関が1、DHL、クロモアガーSTEC、クロモアガー0157、CT-SMAC、血液寒天培地の併用機関が1、SSB、DHL、クロモアガーSTEC、クロモアガー0157、BCM 0157、CT-SMAC、CT-RMACの併用機関が1、SSB、DHL、クロモアガーSTEC、CT-RMAC、CT-SBMAC、馬血液寒天培地の併用機関が1だった。分離培地には、これまで選択性の強い培地と弱い培地、特異性のある培地と無い培地、性質の異なる2種類以上の培地の併用を提唱してきたが、今回、全ての機関で2種類以上の分離培地が使用された。

確認培地は、3機関がTSI、LIM、VP、クエン酸塩培地、CLIGの5種類を使用し、1機関がTSI、LIM、VP、クエン酸塩培地、CLIG、メラリジン培地の6種類を使用した。

全ての機関がグラム染色、オキシダーゼ、TSI、LIM、VP、クエン酸分解能、CLIGを実施した。カタラーゼ実施の記載があるが、呼吸酵素検査はオキシダーゼを実施しているので、当該検査は必須ではないと思慮される。

血清型別試験は、抗血清を用いた血清型別試験が全ての機関で実施され、4機関でO群抗血清を用いた血清型別、1機関でH群抗血清を用いた血清型別が実施された。大腸菌0157鑑別試験として1機関でスライドラテックス凝集反応法による大腸菌0157 検出キット「UNI」(オキソイド)、1機関でスライドラテックス凝集反応法によるE. coli 0157-F「生研」(デンカ生研)を用いた検査が実施された。

毒素検出試験は、2機関でイムノクロマト法によるデュオパス・ベロトキシン(メルク)、1機関で逆受身ラテックス凝集反応法によるVTEC-RPLA「生研」(デンカ生研)、1機関でPCR法による0157(VT1、VT2遺伝子)One Shot PCR Typing Kit ver.2 (TAKARA)、及びLamp法によるベロ毒素タイピング試薬キット(栄研化学)を用いた検査が実施され遺伝子を特定しVT1(+), VT2(+)と判定された。また、3機関で簡易同定キットAPI20E(シスメックス・バイオメリュウ)、もしくはIDテストEB20(日水製薬)を用いた検査が実施された。

1機関でEHEC 0157 VT1(+) VT2(-)という誤同定が為された原因として、ベロ毒素検出試験に検体として用いた菌量が不足していた可能性が考えられた。当該機関で

表2 同定結果

配布菌番号	参加機関No.	合否	配布菌番号	参加機関No.	合否
A-1	2	×	C-1	4	○
	5	○		7	○
	6	○	D-1	1	○
	8	○		5	○
B-1	1	○		9	○
	3	○	E-1	3	○
	4	○		6	○
	7	○		8	○
	9	○	F-1	2	○

実施したベロ毒素検出試験には、イムノクロマト法を原理とする製品(デュオパス・ベロトキシン(メルク))が使用された。本製品の取扱説明書の被検体の調整に関する記述は、「寒天培地より採取した被検大腸菌のコロニーの一つを、SMAC寒天培地上に接種し、培養後、培地上のコロニー(1mm径)の5つ(またはその相当量)を採取し、0.5mg/mlのポリミキシンB溶液0.5mlに懸濁した後、37℃30分間反応させた溶液を検体とする。」となっている。この記述では、検体として採取するコロニーの採取量に関する記述が定量的な表現でないため、採取するコロニーの高さ、密度、さらに採取する被験者の感覚によるばらつきが起こる可能性があると考えられた。今回、検体配布前に当該菌株はPCR法によりVT1(+) VT2(+)が確認されていること、他の機関で当該菌株を対象に同じ製品によるイムノクロマト法、RPLA法、PCR法、LAMP法などのベロ毒素検出試験によりVT1(+) VT2(+)が確認されたこと、誤同定された機関で供試菌量について定量的な検討を行い、正しい結果が得られたことから、誤同定の原因は検体として用いた菌量の不足が原因であったと考えられた。当該試薬は過剰な供試量による擬陽性例も報告されていることから、試薬の使用に際しては試薬の特性に応じた注意点に関する情報を十分に理解し、また新たな試薬を使用する際には、異なる原理の試薬との比較など正しい結果を導くことができるような検討を行うことも必要であると考えられた。

6.3 EHEC 026 : H11 VT1(+) VT2(-)の結果について (表5,6)

配布したのは5機関で、4機関でEHEC 026 VT1(+) VT2(-)、1機関でEHEC 026 : H11 VT1(+) VT2(-)と同定され、良好な結果が得られた。

分離培地は、SSB、DHL、クロモアガーSTECの併用機関が2、SSB、DHL、クロモアガーSTEC、TSAの併用機関が1、SSB、DHL、CT-SMAC、EMB、クロモカルトコリフォームの併用機関が1、SSB、DHL、クロモアガーSTEC、クロモアガー0157、CT-SMAC、CT-RMAC、血液寒天培地の併用機関が1だった。分離培地には、これまで選択性の強い培地と弱い培地、特異性のある培地と無い培地、性質の異なる2種類以上の培地の併用を提唱してきたが、今回、全ての機関で2種類以上の分離培地が使用された。

確認培地は、4機関がTSI、LIM、VP、クエン酸塩培地の4種類を使用し、1機関がTSI、LIM、VP、クエン酸塩

培地、CLIG、酢酸ナトリウム培地の6種類を使用した。

全ての機関がグラム染色、オキシダーゼ、TSI、LIM、VP、クエン酸分解能を実施した。1機関で酢酸塩培地、CLIG、3機関でクロモアガー-STECに紫外線照射してMUG反応を実施した。カタラーゼ実施の記載があるが、呼吸酵素検査はオキシダーゼを実施しているので、当該検査は必須ではないと思慮される。

血清型別試験は、抗血清を用いた血清型別試験が全ての機関で実施され、5機関でO群抗血清を用いた血清型別、1機関でH群抗血清を用いた血清型別が実施された。大腸菌O26鑑別試験として、1機関でイムノクロマト法によるNHイムノクロマトO26(日本ハム)とスライドラテックス凝集反応法によるE.coli O26-F「生研」(デンカ生研)を用いた検査が実施された。

毒素検出試験は、4機関でイムノクロマト法によるデュオパス・ベロトキシン(メルク)、1機関で逆受身ラテックス凝集反応によるVTEC-RPLA「生研」(デンカ生研)とNHイムノクロマトVT1/VT2(日本ハム)を用いて毒素を検出しVT1(+) VT2(-)と判定された。また、4機関で簡易同定キットAPI20E(シスメックス・バイオメリュウ)、もしくはIDテストEB20(日水製薬)を用いた検査が実施された。

6.4 *Salmonella* Thyphimurium 04:i:1,2 の結果について(表7,8)

配布したのは2機関で、2機関全てで*Salmonella* 属O4群と同定され、良好な結果が得られた。

分離培地は、SSB、DHL、TSAの併用機関が1、SSB、DHL、クロモアガーサルモネラ、血液寒天培地の併用機関が1だった。分離培地には、これまで選択性の強い培地と弱い培地、特異性のある培地と無い培地、性質の異なる2種類以上の培地の併用を提唱してきたが、今回、全ての機関で2種類以上の分離培地が使用された。

確認培地は、全ての機関がTSI、LIM、VP、クエン酸塩培地の4種類を使用した。

全ての機関がグラム染色、オキシダーゼ、TSI、LIM、VP、クエン酸分解能を実施した。1機関がMRを実施した。カタラーゼ実施の記載があるが、呼吸酵素検査はオキシダーゼを実施しているので、当該検査は必須ではないと思慮される。

血清型別試験は、O群抗血清を用いた血清型別試験が全ての機関で実施された。さらに簡易同定キットAPI20E(シスメックス・バイオメリュウ)、もしくはIDテストEB20(日水製薬)を用いた検査が実施された。

6.5 *Vibrio parahaemolyticus* 03:K6 の結果について(表9,10)

配布したのは3機関で、2機関で*Vibrio parahaemolyticus* K6、1機関で*Vibrio parahaemolyticus* 03:K6と同定され、良好な結果が得られた。

分離培地は、TCBS、ビブリオ寒天培地の併用機関が1、TCBS、ビブリオ寒天培地、血液寒天培地の併用機関が1、

TCBS、クロモアガービブリオ、1%NaCl加TSAの併用機関が1だった。分離培地には、これまで選択性の強い培地と弱い培地、特異性のある培地と無い培地、性質の異なる2種類以上の培地の併用を提唱してきたが、今回、全ての機関で2種類以上の分離培地が使用された。

確認培地は、全ての機関がNaCl加TSI、NaCl加LIM、NaCl加VP、及び食塩耐性増殖試験のためのペプトン水(食塩濃度0%、3%、8%、10%)の4種類を使用した。

全ての機関がグラム染色、オキシダーゼ、NaCl加TSI、NaCl加LIM、NaCl加VP、食塩耐性増殖試験を実施した。

血清型別試験は、抗血清を用いた血清型別試験が全ての機関で実施され、3機関でK群抗血清を用いた血清型別、1機関でO群抗血清を用いた血清型別が実施された。

毒素検出試験は、1機関で逆受身ラテックス凝集反応法によるKAP-RPLA「生研」(デンカ生研)を用いて耐熱性溶血毒(+)と判定された。また、2機関で簡易同定キットIDテストEB20(日水製薬)を用いた検査が実施された。

6.6 *Aeromonas hydrophila*の結果について(表11,12)

配布したのは3機関で、3機関全てで*Aeromonas hydrophila*と同定され良好な結果が得られた。

分離培地は、SSB、DHLの併用機関が2、SSB、DHL、X-SAL、血液寒天培地の併用機関が1だった。分離培地には、これまで選択性の強い培地と弱い培地、特異性のある培地と無い培地、性質の異なる2種類以上の培地の併用を提唱してきたが、今回、全ての機関で2種類以上の分離培地が使用された。

確認培地は、全ての機関がTSI、LIM、VP、クエン酸塩培地の4種類を使用した。

全ての機関がグラム染色、オキシダーゼ、TSI、LIM、VP、クエン酸分解能を実施した。カタラーゼ実施の記載があるが、呼吸酵素検査はオキシダーゼを実施しているので、当該検査は必須ではないと思慮される。

全ての機関で、簡易同定キットAPI20E(シスメックス・バイオメリュウ)、IDテストEB20(日水製薬)、またはRAPID20E(日水製薬)を用いた検査が実施された。

6.7 *Staphylococcus aureus* Enterotoxin-A、コアグララーゼⅢ型の結果について(表13,14)

配布したのは1機関で、その機関で黄色ブドウ球菌と同定され、良好な結果が得られた。

分離培地は、卵黄加マンニット食塩寒天培地とTSAを使用した。

グラム染色、卵黄反応、コアグララーゼ試験、カタラーゼを用いた検査を実施した。カタラーゼ反応は連鎖球菌との鑑別に用いられるので実施が望ましい。確認試験として、ラテックス凝集反応による黄色ブドウ球菌鑑別試薬PSラテックス試薬「栄研」(栄研化学)を実施し黄色ブドウ球菌であることが確認された。

表3 EHEC 0157:H7 VT1(+) VT2(+)の検査結果について①

配布機関	同定結果		分離培地	確認培地
2	1回目	腸管出血性大腸菌 0157 VT1(+) VT2(-)	SSB、DHL、 α -STEC、 CT-RMAC、CT-SBMAC、 血液寒天培地、	TSI、LIM、VP、SC、CLIG、 メラリジン
	2回目	腸管出血性大腸菌 0157 VT1(+) VT2(+)		
5	<i>Escherichia coli</i> 0157 VT1(+) VT2(-)		DHL、 α -0157、 血液寒天培地	TSI、LIM、VP、SC、CLIG
6	Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> (EHEC) 0157 VT1(+) VT2(+)		SSB、DHL、 α -STEC、 α -0157、BCM-0157、 CT-SMAC、CT-RMAC	TSI、LIM、VP、SC、CLIG
8	<i>Escherichia coli</i> 0157:H7 VT1(+) VT2(+)		DHL、 α -STEC、 α -0157、CT-SMAC、 血液寒天培地	TSI、LIM、VP、SC、CLIG

表4 EHEC 0157:H7 VT1(+) VT2(+)の検査結果について②

	グラム染色	オキシダーゼ	カタラーゼ	TSI				LIM			VP	シモンズクエン酸塩	CLIG			メラリジン	血清型別	同定キット(*)
				斜面	高層	ガス	硫化水素	リジン	インドール	運動性			斜面	高層	UV照射蛍光			
2	NR	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	・抗血清：0157(+)	・デューハース・モキシ：VT1(+)、VT2(+)
5	NR	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	・抗血清：0157(+)	・デューハース・モキシ：VT1(+)、VT2(+) ・IDテストEB20:0151453
6	NR	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	・抗血清：0157(+) ・E.coli0157-F「生研」：(+)	・VTEC-RPLA「生研」：VT1(+)、VT2(+) ・API20E:5144172
8	NR	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	・抗血清：0157(+)H7(+) ・大腸菌0157検出キット「UNI」：(+)	・0157 One Shot PCR Typing Kit ver.2：VT1(+)、VT2(+) ・毒素タンパク質試験キット：VT1(+)、VT2(+) ・API20E:5144172

NR: Negative Rod 空欄: 検査未実施または結果不記載

(*) : 毒素検出試験等含む

表5 EHEC O26:H11 VT1(+)VT2(-)の検査結果について①

配布機関	同定結果	分離培地	確認培地
1	腸管出血性大腸菌 O26 VT1(+) VT2(-)	SSB、DHL、クロモア ⁺ -STEC	TSI、LIM、VP、SC
3	EHEC O26 VT1(+) VT2(-)	SSB、DHL、クロモア ⁺ -STEC	TSI、LIM、VP、SC
4	Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> (EHEC) O26 VT1(+) VT2(-)	SSB、DHL、クロモア ⁺ -STEC、 TSA	TSI、LIM、VP、SC
7	Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> O26 VT1(+) VT2(-)	SSB、DHL、クロモア ⁺ -STEC、 クロモア ⁺ -O157、CT-SMAC、 CT-RMAC、血液寒天培地	TSI、LIM、VP-MR、SC
9	<i>Escherichia coli</i> O26:H11 VT1(+) VT2(-)	SSB、DHL、CT-SMAC、 EMB、クロモカルトコロフォーム	TSI、LIM、VP、SC、CLIG、 酢酸ナトリウム培地

表6 EHEC O26:H11 VT1(+)VT2(-)の検査結果について②

配布機関	グラム染色	オキシダーゼ	カタラーゼ	TSI				LIM			VP	MR	シモンズクエン酸塩	酢酸塩	CLIG			血清型別	同定キット(*)
				斜面	高層	ガス	硫化水素	リジン	インドール	運動性					斜面	高層	UV照射蛍光		
1	NR	-		+	+	+	-	-	+	+	-		-					・抗血清：O26(+)	・デュオバ ⁺ スベ ⁺ トキシソ: VT1(+)、VT2(-) ・IDテストEB20:0151423
3	NR	-		+	+	-	-	-	+	+	-		-					・抗血清：O26(+)	・デュオバ ⁺ スベ ⁺ トキシソ: VT1(+)、VT2(-) ・IDテストEB20:0151423
4	NR	-		+	+	+	-	+	+	-	-		-					・抗血清：O26(+)	・デュオバ ⁺ スベ ⁺ トキシソ: VT1(+)、VT2(-) ・IDテストEB20:0151433
7	NR	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-					・抗血清：O26(+) ・NH ₄ M/コロト O26: (+) ・E.coli O26-「生研」:(+)	・VTEC-RPLA「生研」: VT1(+)、VT2(-) ・NH ₄ M/コロト VT1/VT2: VT1(+)、VT2(-) ・API20E:5144172
9	NR	-		+	+	+	-	-	+	+	-		-	+	-	+	+	・抗血清：O26(+)H11(+)	・デュオバ ⁺ スベ ⁺ トキシソ: VT1(+)、VT2(-)

NR: Negative Rod 空欄: 検査未実施または結果不記載

(*) : 毒素検出試験等含む

表7 *Salmonella* Thyphimurium O4:i:1,2の検査結果について①

配布機関	同定結果	分離培地	確認培地
4	<i>Salmonella</i> 属 O4群	SSB、DHL、TSA	TSI、LIM、VP、SC
7	<i>Salmonella</i> 属 : O4群	SSB、DHL、クロモア ⁺ -サルモネラ、 血液寒天培地	TSI、LIM、VP-MR、SC

表8 *Salmonella* Thyphimurium 04:i:1,2 の検査結果について②

配布機関	グラム染色	オキシダーゼ	カタラーゼ	TSI				LIM			VP	MR	シモンズクエン酸塩	血清型別	同定キット
				斜面	高層	ガス	硫化水素	リジン	インドール	運動性					
4	NR	—		—	+	+	+	+	—	+	—		+	・抗血清：04(+)	・IDテストEB20:1050233
7	NR	—	+	—	+	+	+	+	—	+	—	+	+	・抗血清：04(+)	・API20E:670475251

NR: Negative Rod 空欄: 検査未実施または結果不記載

表9 *Vibrio parahaemolyticus* 03:K6 の検査結果について①

配布機関	同定結果	分離培地	確認培地
1	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> K6	TCBS、ビブリア	2%NaCl加TSI、2%NaCl加LIM、 2%NaCl加VP 0%・3%・8%・10%NaCl加フイオン
5	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> K6	TCBS、ビブリア、血液寒天培地	2%NaCl加TSI、2%NaCl加LIM、 2%NaCl加VP 0%・3%・8%・10%NaCl加フイオン
9	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> 03:K6 耐熱性溶血毒(+)	TCBS、クロモゲン・ビブリア、 1%NaCl加TSA	1%NaCl加TSI、1%NaCl加LIM、 1%NaCl加VP 0%・3%・8%・10%NaCl加フイオン

表10 *Vibrio parahaemolyticus* 03:K6 の検査結果について②

配布機関	グラム染色	オキシダーゼ	カタラーゼ	NaCl加TSI				NaCl加LIM			NaCl加VP	NaCl加ペプトン水				血清型別	同定キット(*)
				斜面	高層	ガス	硫化水素	リジン	インドール	運動性		0%	3%	8%	10%		
1	NR	+		-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	・抗血清：K6(+)	・IDテストEB20:0150003
5	NR	+		-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	・抗血清：K6(+)	・IDテストEB20:0151003
9	NR	+		-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	・抗血清：03(+)K6(+)	・KAP-RPLA「生研」： 耐熱性溶血毒 (+)

NR: Negative Rod 空欄: 検査未実施または結果不記載

(*) : 毒素検出試験等含む

表11 *Aeromonas hydrophila* の検査結果について①

配布機関	同定結果	分離培地	確認培地
3	<i>Aeromonas hydrophila</i>	SSB、DHL	TSI、LIM、VP、SC
6	<i>Aeromonas hydrophila</i>	SSB、DHL	TSI、LIM、VP、SC
8	<i>Aeromonas hydrophila</i>	SS、DHL、X-SAL、 血液寒天培地	TSI、LIM、VP、SC

表12 *Aeromonas hydrophila* の検査結果について②

配布機関	グラム染色	オキシダーゼ	カタラーゼ	TSI				LIM			VP	MR	シモンズクエン酸塩	同定キット
				斜面	高層	ガス	硫化水素	リジン	インドール	運動性				
3	NR	+		-	+	-	-	-	+	+	+		+	・IDテストEB20:2721041
6	NR	+		-	+	+	-	+	+	+	+		+	・API20E:7047125
8	NR	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+		+	・API20E:7247124 ・RAPID20E:0261457

NR: Negative Rod

空欄: 検査未実施または結果不記載

表13 *Staphylococcus aureus* Enterotoxin-A、コアグララーゼⅢ型の検査結果について①

配布機関	同定結果	分離培地
2	黄色ブドウ球菌	卵黄加マンニット食塩寒天培地 TSA

表14 *Staphylococcus aureus* Enterotoxin-A、コアグララーゼⅢ型の検査結果について②

配布機関	グラム染色	集落の色調	溶血性	卵黄反応	マンニット	耐塩性	コアグララーゼ	カタラーゼ	同定キット
2	PC	クリーム色	β	+	+	+	+	+	・黄色ブドウ球菌鑑別試験 PSレックス試薬 「栄研」(栄研化学):陽性

PR: Positive coccus

空欄: 検査未実施または結果不記載

7 まとめ

(1) グラム染色は細菌分類学の基本的手法のひとつであり、細菌同定の必須項目だが、今回全ての機関で履行された。精度管理の際には出来れば、陽性コントロールとして *Staphylococcus aureus*、陰性コントロールとして *Escherichia coli* を同一スライドグラス上で同時に染色し、染まり具合を確認することを勧める。

選択分離培地には、選択性の強い培地と弱い培地、特異性のある培地と無い培地、性質の異なる2種類以上の分離培地を併用がすることが望ましく、時間と経費が許す限り実施すべきと思慮される。

(2) 腸内細菌の同定にあつてはオキシダーゼ、TSI、LIM、VP、クエン酸分解能試験は必須であり、毎年行うよう推奨してきたが、今年度も全ての機関で履行された。

(3) 一般論として菌株の同定手順は、①グラム染色による染色性と形態の確認、②オキシダーゼ試験またはカタラーゼ試験による代謝系の確認、これらの結果を根拠にした、③推定試験・確認培養を原則とする。その後、性状確認不足を補うために、簡易同定キットを使用するのは合理的と思慮される。しかし、菌種の推定に至るまでの手順を実施せず、簡易同定キットの成績をそのまま結果とするのは、本精度管理の趣旨を逸脱する。簡易同定キットはほとんどの機関で使用されているが、可能な範囲で同定手順の原則を順守することが肝要と思慮される。

(4) サルモネラの菌名表記は、平成17(2005)年1月発表のサルモネラ属菌の分類命名に関する国際裁定委員会の提案を原則とし、以下ようになる。

・疫学成績等における場合:

Salmonella Enteritidis または *S. Enteritidis*

・学術論文等における場合：

Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar Enteritidis

また、血清型の決定には、抗血清による型別が必須であり、簡易同定キットによる型別は、あくまでも推定である。

(5) 平成19年6月の感染症法改正により、病原体はその危険性に応じて、一種から四種に分類され、各カテゴリーにより、所持の禁止、許可・届出義務、さらに施設基準が定められた。また、全ての病原体、臨床検体の運搬については、国連の規格に適合した専用容器の使用が義務付けられている。運搬における事故は、1事業所の問題に止まらず国全体の問題となるので慎重な対応が必須となる。

(6) 今回、通常業務の中で分離する機会の少ない菌株も配布されていたため困難な点もあったと考えら

れるが、検査・同定手順の原則に立ち帰る良い機会になったのではないかと思慮される。今後も GLP に係る試験検査実施標準作業書 (SOP) に記載された菌株を被研菌株として当該事業を進めたいと考えている。

(7) 今回、ほとんどの機関で配布された検体について正しく同定が為された。しかし、1機関で検査試薬の検体として用いた菌量の不足を原因とする誤同定があったが、追試等を実施した結果正しく同定できた。誤同定あるいは同定課程に誤りが認められた場合、原因究明のための追試等を実施し、さらに過去の本調査で指摘した事項が今後に活かすことができるよう、当該調査がより実効性のあるものとした。

水質試験（担当：水環境部）

1 実施機関

試料の調製・配付及び結果の取りまとめは、栃木県保健環境センターが行った。

2 参加機関

地方公共団体の試験検査機関4機関及び環境計量証明事業所14機関、合計18機関が参加した。以下の報告では、それぞれの参加機関をA～Rと表記した。

3 実施項目

実施項目は、水質汚濁防止法（昭和45年12月25日法律第138号）第3条第1項で定められた排水基準項目からCODを選択した。

4 実施期間

平成24年9月4日に試験用試料（模擬排水）を配付し、試験結果報告期限を10月1日とした。

5 模擬試料の調製

試料A、試料B、試料Cについて、それぞれ10mg/L、100mg/L、100mg/Lを想定値として以下のとおり調製し、各100mLを模擬排水として配付した。試料Aは低濃度であるが、2～2.5倍に希釈して試験を実施する事とした。

試料A：L-グルタミン酸(105℃、3hr乾燥)0.600gを約60℃の水300mLに溶かし、冷後、ラクトース水和物(80℃、3hr乾燥)0.120gを溶かし、1000mLとしたものを水で10倍希釈した。

試料B：L-グルタミン酸(105℃、3hr乾燥)1.800gを

約60℃の水300mLに溶かし、冷後、ラクトース水和物(80℃、3hr乾燥)0.360g及び塩化ナトリウム(105℃、3hr乾燥)105gを溶かし、水で3000mLとした。

試料C：D(+)-グルコース(105℃、3hr乾燥)1.676gを水に溶かし1000mLとしたものを水で10倍希釈した。

6 試験方法

試験方法は、「排水基準を定める省令の規定に基づく環境大臣が定める排水基準に係る検定方法（昭和49年9月30日環境庁告示第64号、以下「告示」という）」に定める方法「100℃における過マンガン酸カリウムによる酸素消費量」により分析することとした。

各機関は、3試料について測定を2回ずつ行い、その結果及び試験方法等の詳細を電子メールにて報告することとした。COD値は、有効数字3桁で回答することとした。

7 結果

7.1 概要

参加全機関から提出された全てのデータに基づいて得られた、機関毎のCOD値(mg/L)及び平均値との誤差(%)を表15に示す。一方、全データから算出された基本的な統計データは表16にまとめた。

なお、統計処理には各機関とも配付された3試料について測定を2回ずつ行っているため、データの個数としてn=36(n=2×「機関数18」)、あるいはn=18(平均値からの誤差が大きい方、以後ワーストデータと呼ぶ)のいずれかをを用いて計算を行った。

表 15 機関 (A~R 計 18 機関) 毎の COD 値 (mg/L) 及び平均値との誤差 (%)

	事業所	A	B	C	D	E	F	G	H	I
試料A	COD 値 (mg/L)	9.85	9.82	11.5	12.7	11.6	11.3	10.9	11.4	11.1
		9.85	9.62	11.2	12.0	11.5	11.6	10.6	11.4	10.6
	平均値 との 誤差	-9%	-9%	6%	18%	7%	5%	1%	6%	3%
		-9%	-11%	4%	11%	6%	7%	-2%	6%	-2%
試料B	COD 値 (mg/L)	115	91.2	103	109	99.3	112	92.0	97.4	95.2
		116	96.2	102	109	99.8	109	91.0	97.4	96.7
	平均値 との 誤差	12%	-11%	0%	6%	-4%	9%	-11%	-5%	-8%
		13%	-7%	-1%	6%	-3%	6%	-12%	-5%	-6%
試料C	COD 値 (mg/L)	92.5	95.9	103	109	101	102	94.6	95.3	99.6
		92.5	97.0	103	108	103	102	94.8	95.3	101
	平均値 との 誤差	-7%	-4%	3%	9%	1%	2%	-5%	-4%	0%
		-7%	-3%	4%	8%	3%	2%	-5%	-4%	1%

	事業所	J	K	L	M	N	O	P	Q	R
試料A	COD 値 (mg/L)	9.89	11.3	10.1	9.63	11.7	10.5	14.5	11.3	8.18
		9.39	11.2	10.1	9.81	11.7	10.5	12.5	11.4	7.98
	平均値 との 誤差	-8%	5%	-6%	-11%	8%	-3%	34%	5%	-24%
		-13%	4%	-6%	-9%	8%	-3%	16%	6%	-26%
試料B	COD 値 (mg/L)	125	109	99.9	108	94.5	106	98.6	97.0	95.3
		124	108	99.2	106	94.5	106	101	97.6	97.9
	平均値 との 誤差	21%	6%	-3%	5%	-8%	3%	-4%	-6%	-7%
		20%	5%	-4%	3%	-8%	3%	-2%	-5%	-5%
試料C	COD 値 (mg/L)	98.9	106	98.8	94.3	101	101	107	96.6	94.3
		98.9	106	99.2	96.3	101	99.4	105	95.9	95.9
	平均値 との 誤差	-1%	6%	-1%	-5%	1%	1%	7%	-3%	-5%
		-1%	6%	0%	-3%	1%	0%	5%	-4%	-4%

表 16 基本的な統計データ

	試料A	試料B	試料C
データ数(参加機関数×2回実施分)	36	36	36
平均値	10.8	102.7	99.6
最大値	14.5	125	109
最小値	7.98	91.0	92.5
範囲(最大値-最小値)	6.52	34.0	16.5
標準偏差 (mg/L) S.D.	1.23	8.48	4.46
変動係数(空間精度) CV % (=S.D./平均値)	11.4	8.26	4.47
中央値(メジアン)	11.2	99.9	99.3
最頻値1	11.3	109	101
(出現回数)	3	4	5
最頻値2	11.4	106	95.9
(出現回数)	3	3	3

7.2 度数分布図

参加全機関から報告された3種類の試料の測定結果について、それぞれの度数分布図を図1に示す。

7.3 異常値の棄却

「標準測定方法の併行精度及び再現精度を求めるための基本的方 法 (JIS Z8402-2:1999 (ISO5725-2:1994))」に基づき、提出された全データについて試料毎にグラブスの検定を実施したが、棄却対象となる外れ値(検定統計量が5%棄却限界値を超えるもの)は存在しなかった。

7.4 COD値の複合評価図

機関内におけるCOD値の偏りやばらつきを評価する目的で、想定値が同じ100 mg/Lであった試料Bと試料Cのワーストデータを用いて、複合評価図を作成して図2に示した。結果は、妨害物質の塩化ナトリウムを添加した試料Bでは4機関が平均COD値の±10%の範囲を超えていたが、これを除いた14機関の試料B及び全18機関の試料Cのワーストデータが、平均COD値の±10%以内に収まっていた。

7.5 COD分析値と各種分析条件との相関性の検討

7.5.1 COD分析値と分取量との相関

本来、11mg/L以下の試料のCODを分析する場合は、1回あたり100 mLの検水量の分取が必要となる。今回はこれと異なり、COD想定値が10 mg/Lである試料Aを、まず2倍以上の希釈(40~50mL→100mLにメスアップ)を行ってから分析を実施したため、表16で示されるとおり変動係数(空間精度:参加機関間のばらつきの程度)の値が大きくなったと推測される。

この要因を推測するために、試料Bおよび試料CのCOD値ワーストデータと、それぞれの検水分取量との相関の強さを評価した。その結果を図3に示す。図3より、それぞれの相関係数は、前者が-0.651、後者が-0.491であった。これらの結果にはばらつきがあるが、負の相関、すなわち検水量が減るとCOD値が高値となる傾向

が見られたことから、正確な結果には適正な検水量を用いなければいけないことが確認された。

7.5.2 COD分析値と銀イオン添加量との相関

本試験項目においては、塩化物イオンの妨害除去目的に硝酸銀もしくは硫酸銀(以下:銀イオン)の添加を行うが、銀イオンには同時に触媒の効果もある。また、銀イオンの添加量に比例してCOD値が上昇する傾向がみられる、という報告もある。

今回、試料Bおよび試料CのCOD値ワーストデータと、それぞれへの銀イオンの添加量との相関性の有無を評価した結果を図4に示す。この図より、それぞれの相関係数は、前者が0.361、後者が0.242であることが判明したが、強い相関は確認されなかった。

なお、今回の結果には記載していないが、試料Bと試料Cの全てのCOD分析結果についても銀イオンの添加量との相関性を検証した。その結果、それぞれの相関係数は前者が0.376、後者が0.228であり、これらについても強い相関は確認されなかった。

7.5.3 COD分析値とその他の分析条件との相関

試料Bと試料Cの全データまたはワーストデータと、分析時のその他の条件との相関の有無を評価したが、結果に影響を及ぼしている要因は見いだせなかった。

分析に用いた過マンガン酸カリウム溶液のファクターは、全参加機関において0.95~1.05を満たすものであり、問題はなかった。

分析開始日については、参加機関の70%に相当する13機関が試料到着から1週間以内に実施していたが、残りの5機関は2~4週目に分析を開始していた。しかしながら、それぞれの平均値ならびに変動係数には、違いは見られなかった。これは、今回の配付試料が人工物であり生物的代謝が無かった結果によるとも考えられる。参考として分析開始日とCOD値(平均値、最大値、最小値:試料Cのみ)を表17に示す。

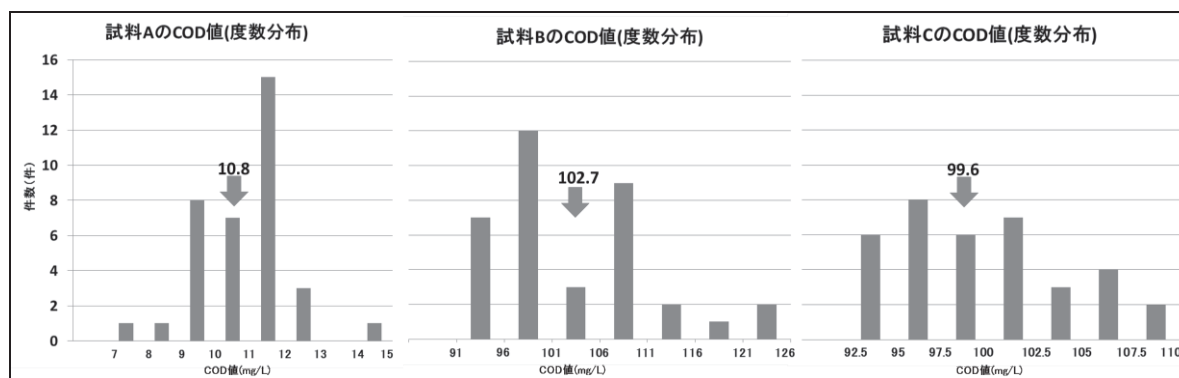


図1 試料A、B、Cの度数分布図(n=36)

矢印とその上に記載した数字は、平均値を示す。

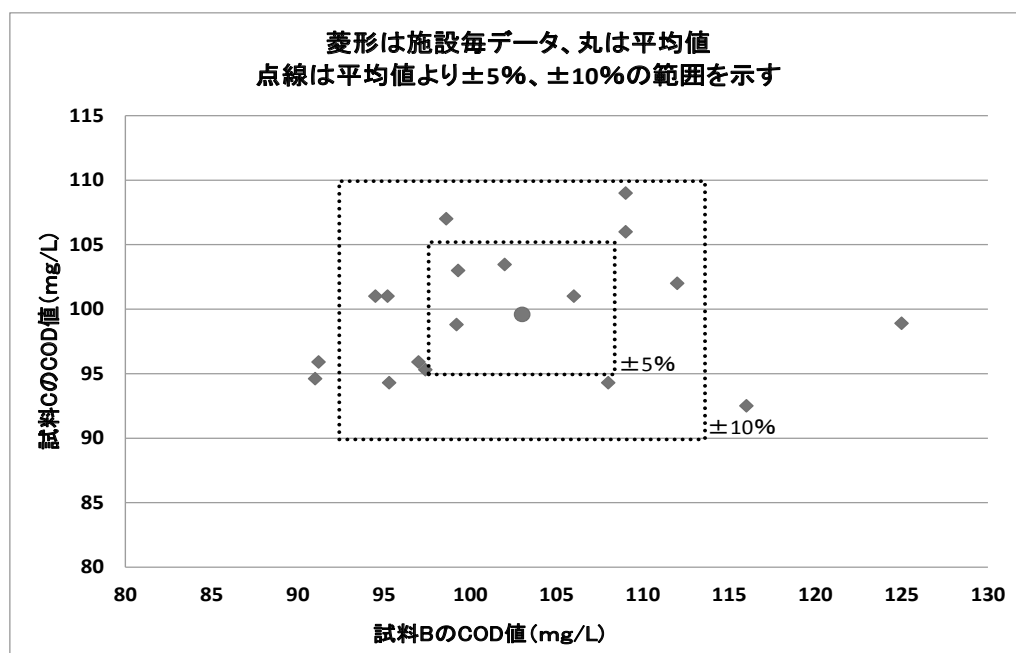


図2 試料Bと試料CのCOD値複合評価図(n=18)

(ワーストデータ : 表15において、機関内で平均値からの誤差が大きい方を選択して結果に用いた場合)
平均値に近い値が出ている機関の結果は、偏りやばらつきが小さいといえる。

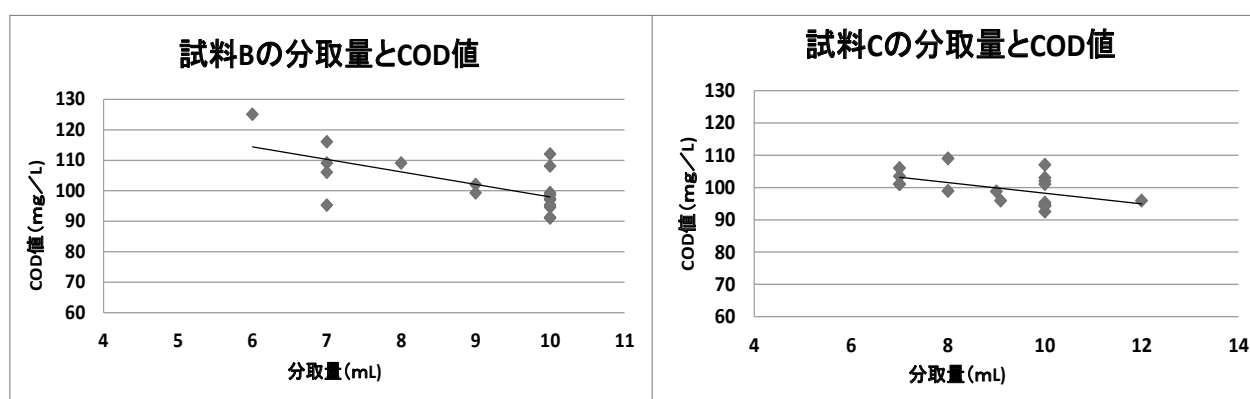


図3 試料B、Cの検水分取量(mL)とCOD値(ワーストデータ)の相関性(n=18)

ばらつきはあるが、試料B、C共に負の相関が認められた。

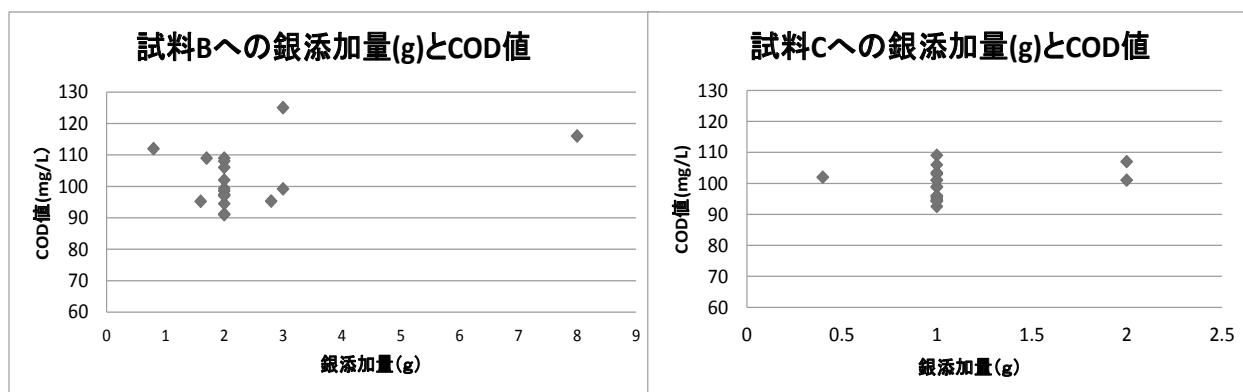


図4 試料B、Cへの銀添加量(g)とCOD値(ワーストデータ)の相関性(n=18)

明確な傾向が出ているとはいい難かった。

表 17 COD 値とその他の条件 (n=36)

測定値に影響を及ぼしている要因は見いだせなかった。

分析開始日とCOD値（試料Cのみ）		試料CのCOD値 (mg/L)		
分析開始週	機関数	平均値	最大値	最小値
1週目 (9/4-9/10)	13	100	109	92.5
2週目 (9/11-9/17)	2	96.4	97	95.9
3週目 (9/18-9/24)	1	101	101	101
4週目 (9/25-10/1)	2	97.1	99.2	94.3

希釈水の種類	期間数	試料名	COD値 (mg/L)		
			最小値	平均値	最大値
蒸留水	10	A	9.62	11.1	14.5
		B	91.0	99.4	109
		C	94.3	99.8	107
イオン交換水	2	A	10.1	10.8	11.4
		B	97.4	98.5	99.9
		C	95.3	97.2	99.2
超純水	6	A	7.98	10.5	12.7
		B	95.3	109.7	125
		C	92.5	100.0	109

表 18 その他の条件 (n=18)

銀塩の種類	硝酸銀AgNO ₃	18
銀塩の種類・状態	液体 (200g/L)	14
	〃 (200g/L, 500g/L)	1
	〃 (200g/L) および固体	2
	固体 (粉状)	1
水浴の加熱方式	電気	8
	ガス	10
試験に用いた三角フラスコの容量 (mL)	300mL	17
	200mL	1
過マンガン酸カリウム溶液の調製法	調製済品	7
	調製済品を希釈	4
	自社調製	7

希釈等で試験に用いる水は、「JIS K 0557 に規定する A 4 の水」と規格の 17. a) 1) に明記されている。今回の参加機関が用いた希釈水の種類と機関数を表 3 に示す。結果は、超純水、蒸留水、あるいはイオン交換と、異な

った 3 種の回答があったが、水質の違いによる結果への影響は確認されなかった。

その他の分析条件については、回答機関数のみの結果を表 18 に示す。

8 総括評価及び今後の課題

各参加機関から提出された今回の結果を総括すると、試料 B ならびに試料 C の COD 分析結果は、概ね平均 COD 値の±10%以内に収まっていた。妨害物質の塩化ナトリウムを添加していた試料 B の結果についての変動係数は 8.26%であり、環境省が平成 23 年度に実施した精度管理調査における同様の試験結果における変動係数 6.1% (n=421) と比較すると、幾分施設間のばらつきがみられる結果となった。しかし、妨害物質の添加がなかった試料 C の結果についての変動係数は 4.47%であり、当センターが平成 8 年度に実施した精度管理調査における同試験の変動係数 10.7% (n=30) と比較して今回は精度の高いものであった。

一方、試料 A に関しては、その想定値が 10mg/L と低く、更に配付された試料を希釈して 10mg/L 未満の試料を測定せざるを得なかったことに起因して、COD 値が高めに分布する結果になった。また試料 B ならびに試料 C についても試料の分取量が少ないと COD 値が高くなる負の相関が確認された。このことから、試料は適切な量を分取して操作を実施すること、特に規定の濃度に達しない試料については分取量に十分配慮する必要性が再確認された。

各機関からの回答を精査すると、分析担当者以外の分析結果の確認が 1 機関を除く全ての機関で実施されていたにも関わらず、データの不備（計算の際に引用するデータを誤った為に発生したと思われる COD 値の誤り、報告値の有効数字の誤り等）が 5 機関で確認された。今回、それらについては確認や再提出を依頼した。回答から確認し得る過マンガン酸カリウムの滴定量に関する生データについては、小数点以下第 1 位までの読み取りしか実施していないと推定される機関が 3 機関あった。試料配付後は速やかに分析を開始すべきことも含め、基本に忠実な分析の実施と分析結果を監査あるいは確認をするための体制の構築が強く望まれる。

COD の分析においては、試験操作の際や試薬調製に使用される水に有機物が含まれてはいけないうのはもちろんのこと、加熱の際の時間、試験途中の温度、加熱方法、ならびに還元性物質による汚染など、反応時の条件のわずかな違いが測定結果に大きな影響を及ぼす事が分かっている。今回参加された各機関においては、本件の結果を踏まえるとともに、これらの諸条件を再点検し、COD 標準物質を用いて分析精度の向上に努めて頂きたい。